

ธีรรา พงษ์นิมิตร : ผลของแอลคาร์นิทีนต่อการเจริญเป็นไข่สุก ความทนทานต่อการแช่แข็ง และการพัฒนาเป็นตัวอ่อนของไข่โคหลังการปฏิสนธิ (EFFECTS OF L-CARNITINE ON MATURATION, CRYO-TOLERANCE AND EMBRYO DEVELOPMENTAL COMPETENCE OF BOVINE OOCYTES AFTER *IN VITRO* FERTILIZATION) อาจารย์
ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 71 หน้า.

การเลี้ยงไข่อ่อนให้สุกภายในห้องปฏิบัติการเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญในการกำหนดถึงความสำเร็จของการผลิตตัวอ่อนภายในห้องปฏิบัติการ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยคือ ศึกษาผลของแอลคาร์นิทีนที่เติมในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่อ่อนต่อการเจริญเป็นไข่สุกและการพัฒนาเป็นตัวอ่อนของไข่โค รวมทั้งการรอดชีวิตและการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสของไข่ที่แช่แข็งแบบ vitrification นอกจากนี้ยังศึกษาผลของแอลคาร์นิทีนที่เติมในขั้นตอนการปฏิสนธิและการเลี้ยงตัวอ่อนต่อการเจริญเป็นตัวอ่อนและคุณภาพของตัวอ่อนด้วย ในการทดลองที่ 1 และ 2 ไข่อ่อนโคจะถูกเลี้ยงในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่อ่อนที่มีความเข้มข้นของแอลคาร์นิทีน 0.3, 0.6 และ 1.2 mg/mL กลุ่มที่ไม่เติมแอลคาร์นิทีนเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นไข่จะถูกตรึงและย้อมด้วยสี aceto-orcein เพื่อตรวจดูการเจริญเป็นไข่สุก จากผลการทดลองพบว่าแอลคาร์นิทีนที่ความเข้มข้น 0.3 และ 0.6 mg/mL มีอัตราการเจริญเป็นไข่สุกสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กลุ่ม 1.2 mg/mL อัตราการเจริญเป็นไข่สุกไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม ต่อมาเมื่อนำไข่ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ทำการปฏิสนธิกับอสุจิในหลอดแก้วแล้วนำมาเลี้ยงต่อในน้ำยาสำหรับเลี้ยงตัวอ่อนพบว่าอัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสในกลุ่ม 0.6 mg/mL เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่กลุ่ม 1.2 mg/mL อัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อนับจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสพบว่าจำนวนมวลเซลล์ชั้นใน (ICM cells) และเซลล์โทรเฟคโตเดอรัม (TE cells) ไม่มีความแตกต่างกันทั้งกลุ่มที่เติมและไม่เติมแอลคาร์นิทีน

ในการทดลองที่ 3 ทำการศึกษาผลของแอลคาร์นิทีนต่อการแช่แข็งไข่โค โดยไข่จากกลุ่มที่มีความเข้มข้นของแอลคาร์นิทีน 0.6 mg/mL จะถูกนำมาแช่แข็ง จากนั้นไข่จะถูกละลายในสารละลายที่เจือจางเป็นลำดับขั้นและทำการปฏิสนธิกับอสุจิในหลอดแก้ว จากผลการทดลองพบว่าอัตราการรอดชีวิตหลังการละลาย อัตราการแบ่งตัว และอัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มที่แช่แข็ง และไม่พบความแตกต่างของจำนวนมวลเซลล์ชั้นในและเซลล์โทรเฟคโตเดอรัมของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสที่ได้จากไข่แช่แข็ง นอกจากนี้ตัวอ่อนระยะ บลาสโตซิสจากไข่ที่แช่แข็ง ยังพบว่ามีความมวลเซลล์ชั้นในและเซลล์โทรเฟคโตเดอรัมต่ำกว่ากลุ่มไข่สดที่ไม่ได้แช่แข็ง ทั้งที่เติมและไม่เติมแอลคาร์นิทีนอีกด้วย

ในการทดลองที่ 4 ความเข้มข้นของแอลคาร์นิทีนที่ 0.6 mg/mL ยังนำมาการศึกษาต่อเนื่องถึงผลของแอลคาร์นิทีนที่เติมในน้ำยาสำหรับการปฏิสนธิและน้ำยาสำหรับเลี้ยงตัวอ่อนต่อการเจริญเป็นตัวอ่อนโค จากผลการทดลองพบว่าการเติมแอลคาร์นิทีนในน้ำยาสำหรับการปฏิสนธิและน้ำยาสำหรับเลี้ยงตัวอ่อนไม่มีผลต่อการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์

การทดลองนี้สรุปได้ว่าการเติมแอลคาร์นิทีนในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่อ่อนโค สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเป็นไข่อ่อนและอัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนโคหลังการปฏิสนธิได้ แต่แอลคาร์นิทีนไม่มีผลต่อไข่อ่อนเมื่อไข่อ่อนถูกแช่แข็งแบบ vitrification นอกจากนี้การเติมแอลคาร์นิทีนตลอดกระบวนการเลี้ยงตัวอ่อน (น้ำยาสำหรับการปฏิสนธิและน้ำยาสำหรับเลี้ยงตัวอ่อน) ไม่มีผลต่อการพัฒนาเป็นตัวอ่อนและคุณภาพของตัวอ่อนโค



สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2555

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

TEEWARA PHONGNIMITR : EFFECTS OF L-CARNITINE ON
MATURATION, CRYO-TOLERANCE AND EMBRYO
DEVELOPMENTAL COMPETENCE OF BOVINE OOCYTES
AFTER *IN VITRO* FERTILIZATION. THESIS ADVISOR : ASSOC.
PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 71 PP.

BOVINE/*IN VITRO* MATURATION/L-CARNITINE/VITRIFICATION/
OOCYTE/EMBRYO DEVELOPMENT

In vitro maturation (IVM) is a crucial step in determining the success of *in vitro* embryo production (IVP). The aim of this study was to evaluate the effects of L-carnitine addition to IVM medium on nuclear maturation and embryo development of bovine oocytes, including survival and blastocyst rate of vitrified-oocytes. Moreover, the effects of L-carnitine during *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* culture (IVC) on the developmental potential and quality of embryos were also examined. In Experiments 1 and 2, immature bovine oocytes were matured in IVM medium supplemented with 0.3, 0.6 and 1.2 mg/mL of L-carnitine (0.3, 0.6 and 1.2 groups, respectively). Oocytes matured in 0 mg/mL of L-carnitine were treated as a control group. The nuclear maturation of oocytes was assessed by fixing and staining with aceto-orcein dye. A significantly higher maturation rate of oocytes was obtained for 0.3 and 0.6 mg/mL groups compared with the control ($P < 0.05$). Although the maturation rate in the 1.2 group (75.8%) appeared higher, it was not significantly different when compared with the control group (67.8%). After IVM, the oocytes were subjected to IVF and cultured *in vitro*. The blastocyst formation rate in the 0.6

mg/mL group was significantly improved, whereas the rate in the 1.2 mg/mL group was significantly decreased when compared with the control group ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in TE and ICM cell numbers among those groups.

In Experiment 3, 0.6 mg/mL of L-carnitine was used to investigate the effects of L-carnitine in IVM of bovine oocytes on their cryopreservation. The survival, cleavage and blastocyst rates were not significantly different between vitrified groups, and additionally, the numbers of TE and ICM cells of blastocysts in vitrified groups were not significantly different and were lower than those of fresh groups irrespective of L-carnitine treatment.

In Experiment 4, 0.6 mg/mL of L-carnitine was used to investigate the effects of L-carnitine in IVF and IVC media on embryo developmental competence. Supplementation of IVF and IVC media with L-carnitine had no positive effect on embryo development to the blastocyst stage.

In conclusion, the supplementation of L-carnitine during IVM of bovine oocytes improved their nuclear maturation and subsequent embryo development after IVF, but when they were vitrified the improving effects were neutralized. Additionally, L-carnitine supplementation throughout the entire IVP process (IVF and IVC) did not improve developmental capacity and quality of resulting bovine embryos.

School of Biotechnology

Academic Year 2012

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____